

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-180190

(43)Date of publication of application : 06.08.1991

---

(51)Int.Cl.

C12P 19/26

---

(21)Application number : 02-293791

(71)Applicant : FORSCHUNGSZENTRUM

JUELICH GMBH

CIBA GEIGY AG

(22)Date of filing : 01.11.1990

(72)Inventor : KRAGL UDO

WANDREY CHRISTIAN

GHISALBA ORESTE

GYGAX DANIEL

---

(30)Priority

Priority number : 89 3937891 Priority date : 15.11.1989 Priority country : DE

---

### (54) ENZYMATIC PREPARATION OF N-ACETYLNEURAMINIC ACID

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently, inexpensively obtain N-acetylneuraminic acid useful as e.g. a medicine by feeding a reactor containing both epimerase and lyase with both N-acetylglucosamine and pyruvate to carry out an enzymatic reaction.

CONSTITUTION: A reactor is housed with N-acetylglucosamine-2-epimerase and N-acetylneuraminic acid-pyruvate-lyase. Subsequently, the reactor is fed with N-acetylglucosamine and pyruvate. Then, the N-acetylglucosamine is isomerized to N-acetylmannosamine by the aid of the epimerase followed by converting the N-acetylmannosamine to N-acetylneuraminic acid by the use of pyruvic acid by the action of the lyase. From the stream discharged from the reactor, the N-acetylneuraminic acid is then isolated and collected using e.g. an ion exchanger column. It is suitable that the reactor to be used is an enzyme membrane reactor.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-180190

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成3年(1991)8月6日

C 12 P 19/26

8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全8頁)

⑬ 発明の名称 N-アセチルノイラミン酸の酵素的製造方法

⑭ 特 願 平2-293791

⑮ 出 願 平2(1990)11月1日

優先権主張 ⑯ 1989年11月15日 ⑰ 西ドイツ(DE) ⑱ P 39 37 891.8

⑲ 発 明 者 ウド・クラグル ドイツ連邦共和国、ユーリツヒ、アルティレリー ストラ  
ーセ、56

⑳ 出 願 人 フォルシュングスツェ  
ントルム・ユーリツ  
ヒ・ゲゼルシャフト・  
ミト・ベシユレンクテ  
ル・ハフツング  
ドイツ連邦共和国、ユーリツヒ、ウイルヘルム・ヨーネ  
ン・ストラーセ(番地無し)

㉑ 代 理 人 弁理士 江崎 光好 外3名  
最終頁に続く

# 明細書

## 1. 発明の名称

N-アセチルノイラミン酸の酵素的製造方法

## 2. 特許請求の範囲

1. N-アセチルノイラミン酸形成を、エピメラーゼだけでなくリアーゼをも包含しそしてN-アセチルグルコサミンおよびビルバートが供給される反応器内で引起し、そしてその流出物からN-アセチルノイラミン酸を得ることを特徴とする、(a)N-アシルグルコサミン-2- エピメラーゼ(E.C. 5.1.3.8)の存在下にN-アセチルグルコサミンをN-アセチルマンノサミンに異性化し、次いで(b)N-アセチルマンノサミンをN-アセチルノイラミン酸- ビルバート- リアーゼ(E.C. 4.1.3.3)の存在下にビルビン酸を用いてN-アセチルノイラミン酸に転換することによるN-アセチルノイラミン酸の製造方法。

2. 反応が連続的に行われる、請求項1記載の方法。

3. 反応が1000u以上のカットオフを持つ限外濾過膜を持つ酵素膜反応器内で行われる、請求項2記載の方法。

4. エピメラーゼおよびリアーゼが、反応器内で、それぞれの酵素転換速度からの商の逆数に対応する活性比にある、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

5. 反応器内でビルバートに対してN-アセチルグルコサミンの過剰に配慮し、場合によりビルバートが後配量される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

6. 反応器の流出物を送ってイオン交換体カラムによりN-アセチルノイラミン酸を分離しそして残りを反応器内に戻す、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

7. 酵素反応をpH7.5でかつ25℃で進行させる、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

8. 0.2～10時間の、特に4時間の平均持続時間で行われる、請求項3～7のいずれか1項

特開平3-180190 (2)

に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、(a)N-アシルグルコサミン-2- エピメラーゼ(E.C. 5.1.3.8)の存在下にN-アセチルグルコサミンをN-アセチルマンノサミンに異性化し、次いで(b)N-アセチルマンノサミンをN-アセチルノイラミン酸- ビルパート- リアーゼ(E.C. 4.1.3.3)の存在下にビルビン酸を用いてN-アセチルノイラミン酸に転換することによるN-アセチルノイラミン酸の製造方法に関する。

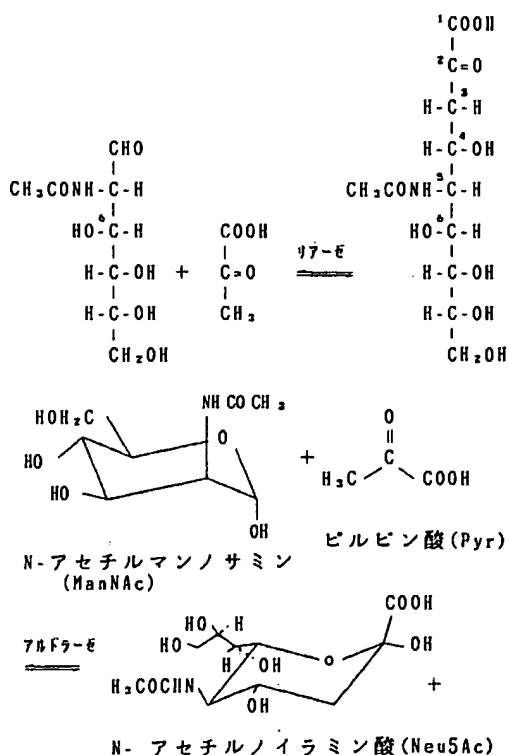
〔従来の技術および発明が解決しようとする課題〕

N-アセチルノイラミン酸（以下Neu5Acと略す）はシアル酸類の重要な代表物質である。シアル酸は、例えば細胞表面にありそして細胞の分化、成熟および細胞内相互作用の際に重要な作用を行う、糖脂類および糖タンパク質のような糖接合体のグリコシド末端を占める。末端にシアル酸を有する短鎖のオリゴ糖、特にNeu5Acの合成はますます重要になってきている。同様に癌疾病のNeu5Ac- 誘

導体による治療に関して報告されている(S. Sabsan ら, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986), 2068-2080; R. Schauer, R. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 40, (1982), 132-234を参照のこと)。

Neu5Acは従来天然源から単離されていた(Kuhmlich, Schwalbennester; 上記Shauerを参照のこと)。この源はしかしながらその入手可能性が限定されておりそしてその精製は、その中に存在する多数のシアリン酸によって困難でありかつ時間がかかる。

N-アセチルマンノサミンおよびビルビン酸（以下ManNAcおよびPyr と略す）からNeu5Acを酵素的に合成することは既に60年以来知られている(Comb ら, J. Biol. Chem. 235 (1960), 2529-2537)。使用された酵素はN-アセチルノイラミン酸- ビルパート- リアーゼ(E.C. 4.1.3.3.) (以下リアーゼと略す)である。その際次の反応が起こる：



より新しい論文において(M.-J. Kimら, J. Am. Chem. Soc. 110, (1988) 6481-6486 並びに C. Augéら, Tetrahedron Letters 30, (1989), 2217-2220) Neu5Ac の合成について報告されており、その際リアーゼは固定された状態で不溶性担体(PANまたはアガロース)上に共有結合で連結して使用される。この固定された状態で、原則において、連結による活性の損失を記載し得る。担体に固定された酵素を使用して連続的に製造することは、単に抗菌性作用剤を用いて可能であるにすぎない。

このN-アセチルノイラミン酸の形成のための出発物質は比較的高価なN-アセチルマンノサミンであり、これはN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)から入手できることが既に上に引用したM.-J. Kimの論文に示されている。該文献は、ManNAcの入手可能性としてGlcNAcの、ManNAcの形成下での化学的方法での塩基触媒異性化またはNeu5Acの製造過程におけるGlcNAcの、ManNAcへのエピメラーゼ触媒異性化の採用を考慮しているが、エピメラーゼ、およびGlcNAcをManNAcに転換するエピメラーゼの

## 特開平3-180190 (3)

有用性はずっと以前から知られてはいるが、具体的には報告されていない(Ghoshら J. of Biol. Chem. 240 (1965) 1531-6)。

一方では是認されたGlcNAcから出発し他方では中間分離を回避できそして好ましくは活性の低下を回避する方法を達成するという課題が、本発明の基礎になっている。

(課題を解決するための手段)

この目的のために開発された本発明による方法は、N-アセチルノイラミン酸の形成を、エピメラーゼだけでなくリアーゼをも包含しそしてN-アセチルグルコサミンおよびビルバートが供給される反応器内で引起し、そしてその流出物からN-アセチルノイラミン酸を得ることを特徴とする。

該方法は、優れた方法で、GlcNAcがリアーゼのために転換されないことおよび後者は比較的安価なことそしてそれ故リアーゼの活性のため最適ではない条件の下で使用され得ることという事実を利用する。該方法は、両方の酵素の安定性—およびpH—最適条件が似ているという知見に基づく。

固定は従って不必要である。反応器は作業を始める前に滅菌され、その結果抗菌性作用剤の添加を省略し得る。

EMR は出発条件下に操作されるので、流入-pHを対応して調整すれば、同様に緩衝物質を省略し得る。これらの物質の省略は、記載された方法で同様に行われている(上述のR. Shauer を参照のこと)後の生成物分離を容易にする。

エピメラーゼだけでなくリアーゼも同一の反応系において使用することは、両方の酵素の酵素活性に適合した適当な反応条件の選択を不可欠にする:

それ故、第一に、リアーゼによるNeu5Ac形成だけでなくエピメラーゼによるManNAc形成のための酵素反応のpH依存性を試験する: 添付の第1図および第2図は、およそ中性の範囲(pH 7)が選択されたpH値が両方の反応に有利であることが分かる25℃で得られた曲線を示す。

pH 7.5でのNeu5Ac形成の平衡定数の温度依存性の試験(第3図を参照のこと)は、Neu5Ac形成

反応条件を最善の状態にすることによって、エピメラーゼおよびリアーゼという両方の酵素の活性を相互に一致しそして例えばエピメラーゼに対するビルバートの抑制作用は、より低いビルバート濃度によって押さえられる。反応系内に存在するビルバートはそれ自体比較的低い濃度で形成されるManNAcに対して著しく過剰でありその結果Neu5Acへの転換はManNAcの消費のもとで円滑に進行し、GlcNAcからのNeu5Acの形成はManNAcによって促進される。

反応器内の適当な濃度は50~500mMol GlcNAc/l、特に約200mMol GlcNAc/lおよび30~200mMol ビルバート/l、特に50~500mMol ビルバート/l、殊に約80mMolまでのビルバート/lである。

好ましくは、連続的にそして特に酵素膜反応器内で操作される。

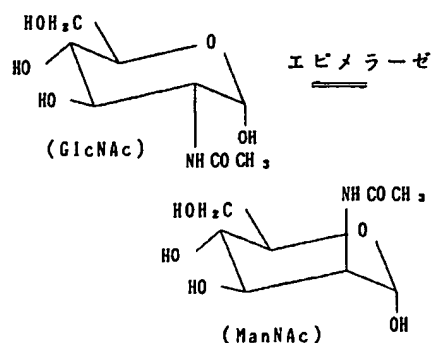
酵素膜反応器(EMR)においては、溶解状態でその中に存在する酵素は反応器出口の前に位置する適合したカットオフを有する限外濾過膜によって保有される。相当する活性の減少を伴う担体

には原則的にできる限り低い温度が有益であることを明らかにする: しかしながら、低温(例えば10℃)では酵素活性の明らかな減少が起こりそして前に行われた反応としての転換に関して速度を決定する糖の変旋光作用( $\alpha$ -アノマー $\rightleftharpoons$  $\beta$ -アノマー)が低温でより僅かにすばやく消失するので、約25℃で作業するのが適当である。

第2A図に示すように、ビルビン酸によるGlcNAcのManNAcへの異性化はビルビン酸の濃度が上昇すると共にますます抑制される。さらに試験は、生成物として望まれるN-アセチルノイラミン酸がエピメラーゼに対して抑制作用を及ぼすことをも示している。

EMR 内で、同じ反応系で進行する二段階合成のためにGlcNAcおよびビルバートが供給される。エピメラーゼおよびリアーゼが反応器内に存在すると、その時まず第一に次の化学方程式に従い、アシルグルコサミン-2- エピメラーゼによるGlcNAcのManNAcへの転換が起こる:

## 特開平3-180190 (4)



形成されたManNAcはその時にビルバートの大過剰に直面し、それによってNeu5Acへの次の転換が促進される。

その逆反応は、さらに、第4図から推断され得るように、形成されたNeu5Acと比較してかなり過剰に存在するビルバートの量によって強く抑制される。

第5図は、本質的に本発明による反応系内に非常に過剰に存在するビルバートの量によって、Neu5Ac形成の平衡定数のより高い値への移動が促進されることを示す。

ン交換体カラムを経て送りそして残りを反応器に送り戻すことが有効である。交互に操作される2つのカラムが有効である。

第6図に示すように、アニオン交換カラム(Dowex 1×2、ギ酸塩、25℃)上でNeu5AcがManNAcより強く固定され従ってカラム上に集中されることができる。同様に結合されたPyrは相応して置換されねばならない。

最適に全転換のため、従来存在する技術に従って、0.2～10時間、特に約4時間の持続時間が有用である。

調整された反応について見出された広いpH範囲を考慮して、第1図および第2図から明らかにわかるように、さほど活性損失もなくpH6および8の間操作され得る。小さいpH変化は達せられる転換にほとんど影響をもたらさないで、この広い範囲は緩衝物質の使用のない連続作業における操作を容易にする。緩衝物質の省略は、それにより処理が容易にされるので、価値がある。

緩衝物質は、通常、生成物分離のために使用さ

異性化およびNeu5Ac形成は同じ系内で同時に存在する酵素によって同時に進行すべきなので、酵素の活性を互いに調整することが重要であり、その際、平衡においてほぼ同等の変化が得られるべきであるということから出発する。

それに次いで、反応器内での両方の酵素の活性比(その値はそれぞれの酵素の転換速度からの商の逆数に対応する)が互いに役立つ。

出発物質のGlcNAcおよびビルバートの供給の際に、GlcNAcの量には制御機能が付随し、その結果これは少なくとも比較しうるモル濃度で反応器内に存在すべきであるということを考慮に入れるべきであり、しかし好ましくはビルバートに対して過剰に使用される。ビルバートの大過剰は、エピメラーゼがビルバートによって抑制されるので回避されるべきである。

形成されるNeu5Acは、平衡状態に応じて多少著しい再分裂の逆反応の影響下にある。この反応は確かにビルバートの過剰によって抑制される(第4図参照)が、連続的な反応媒体をBMRからイオ

陰イオン交換体に結合されそして適当なクロマトグラフィーの条件により分離されねばならないイオン化合物である。典型的なクロマトグラムを第6図に明示する。それは陰イオン交換体のDowex 1×2が使用される。溶離剤としてギ酸1mol/lが用いられる。ほぼファクター8のスケールアップが当該酸について行われ、その際分離能力が維持される。

## 〔実施例〕

酵素膜反応器内でのN-アセチルノイラミン酸の酵素触媒生産のための例基質の流入濃度

N-アセチルグルコサミン	200・10 <sup>-3</sup> mol/l
Na-ビルバート	100・10 <sup>-3</sup> mol/l
ATP	5・10 <sup>-3</sup> mol/l
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	5・10 <sup>-3</sup> mol/l

基質を水に溶解する。希希性ソーダ溶液でpH7.2に調整する。

反応器内の酵素濃度

エピメラーゼ	11.9mg/ml
--------	-----------

特開平3-180190 (5)

アルドラーゼ 3.4 mg / ml

実施条件

温度 25 °C

反応器出口でのpH 7.2~7.5

反応器容積 12 ml

持続時間 2.85 時間

結果

反応器の出口で次の濃度が測定された：

-N-アセチルノイラミン酸 35mmol / l

-N-アセチルマンノサミン 20mmol / l

使用されたNa-Pyrに関して35%の変化が得られた。N-アセチルノイラミン酸の空時収量は109 g / (l · d)であった。

4. 図面の簡単な説明

添付の図面は本発明のよりよい理解に役立つ。

それぞれ、

第1図、第2図および第4図は、pH値による酵素の相対活性の曲線を示し、

第2A図はビルバート濃度によるエピメラーゼの相対活性の曲線を示し、

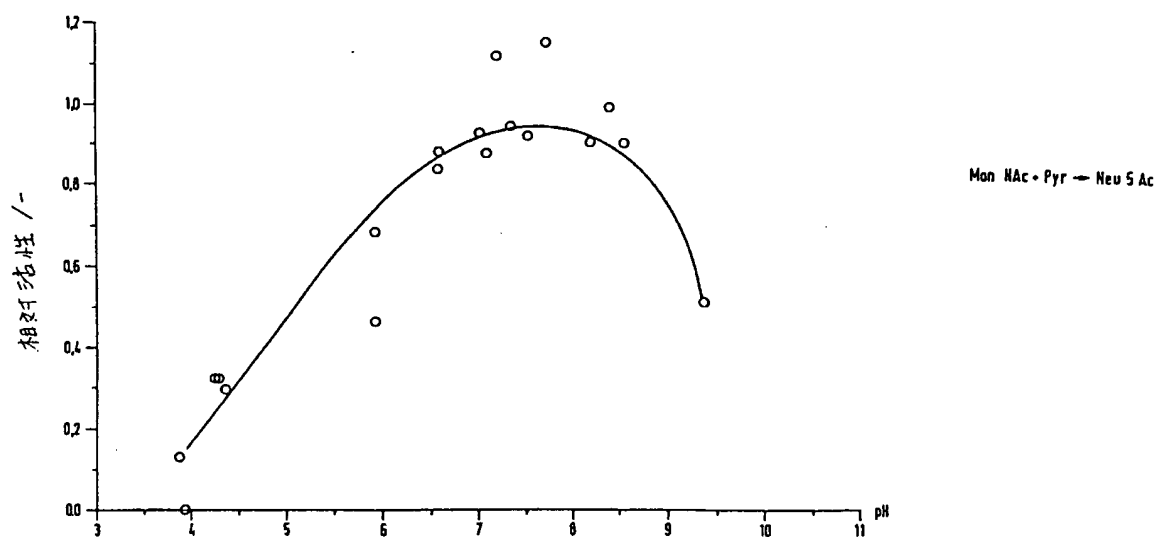
第3図はNeu5Ac形成の平衡定数の温度依存の曲線を示し、

第5図は種々のManNAc濃度範囲に関するPyr/ManNAc比による平衡転換を示し；そして

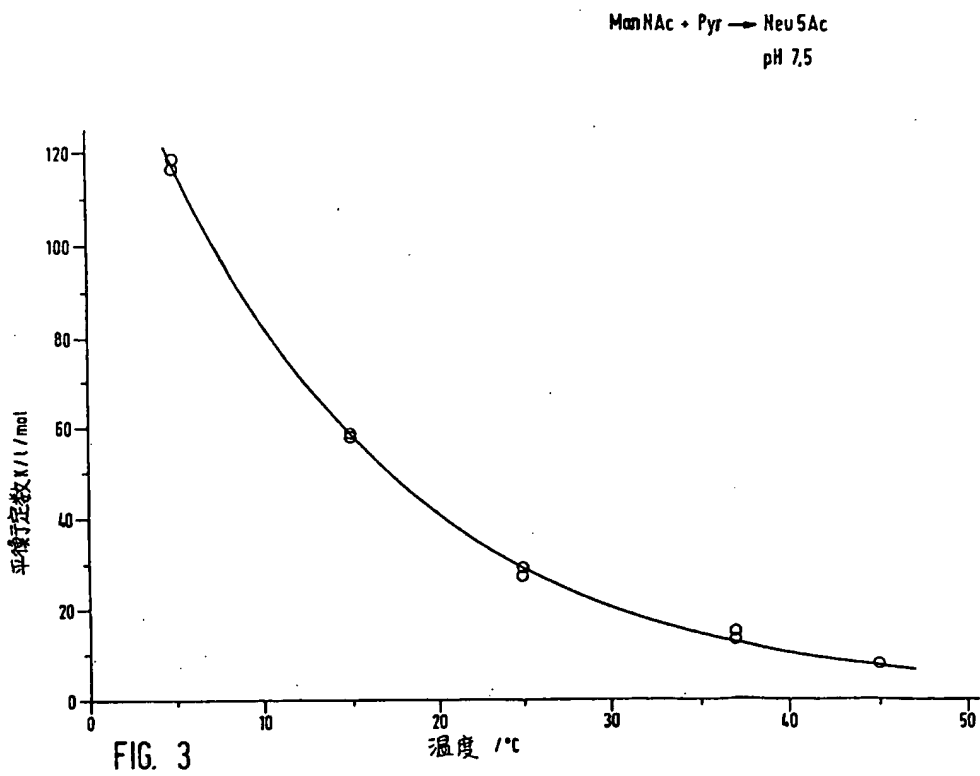
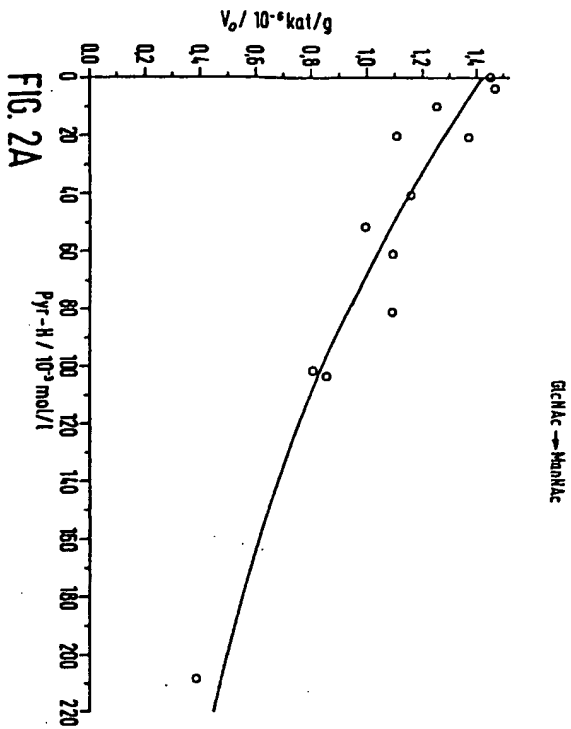
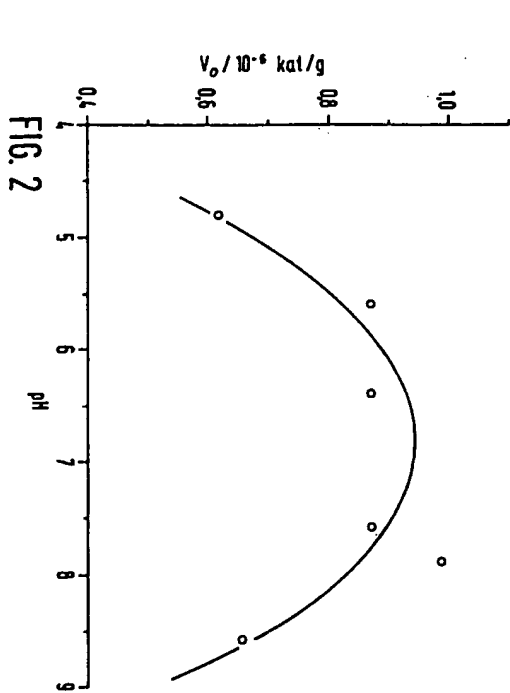
第6図は陰イオン交換カラム体上でのManNAc、Neu5AcおよびPyr-IIの溶離特性を示す。

代理人 江崎光好(他3名)

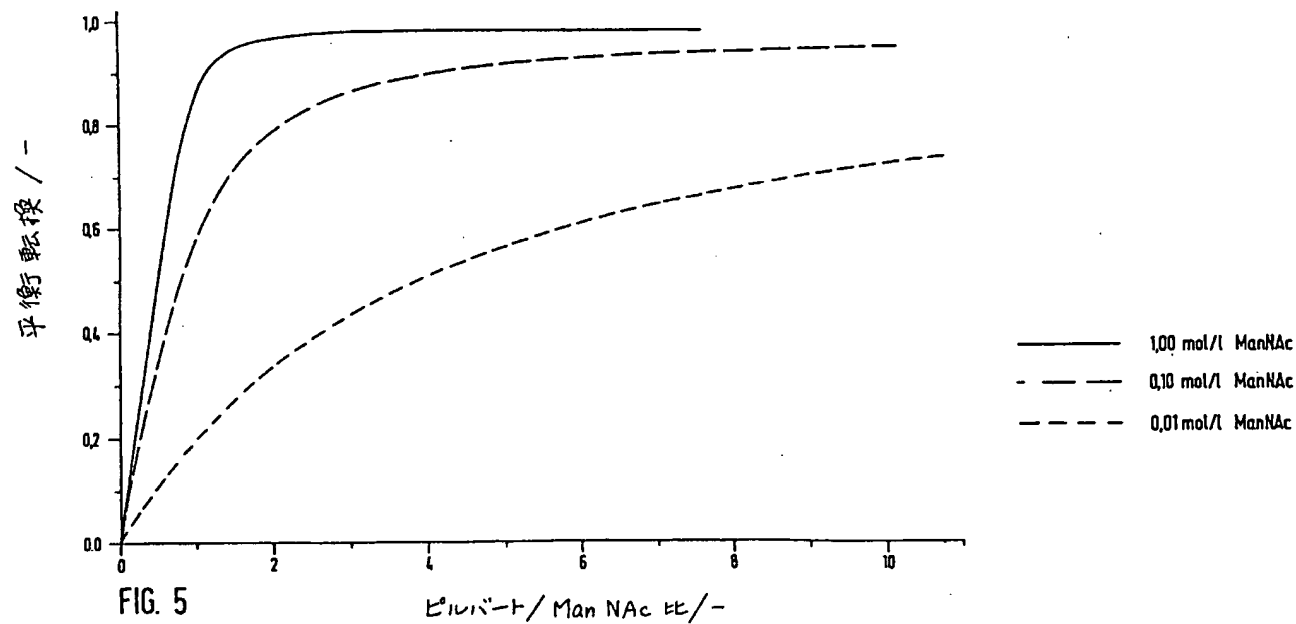
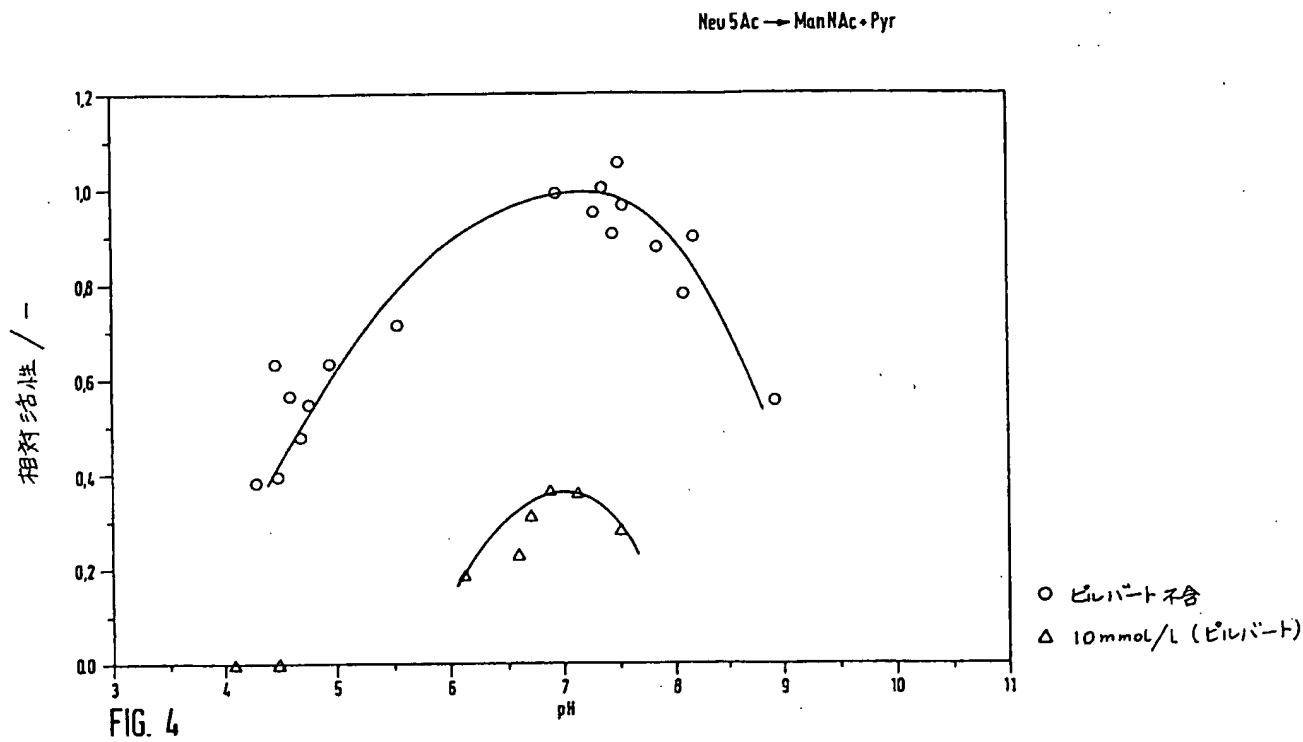
FIG. 1



特開平3-180190 (6)

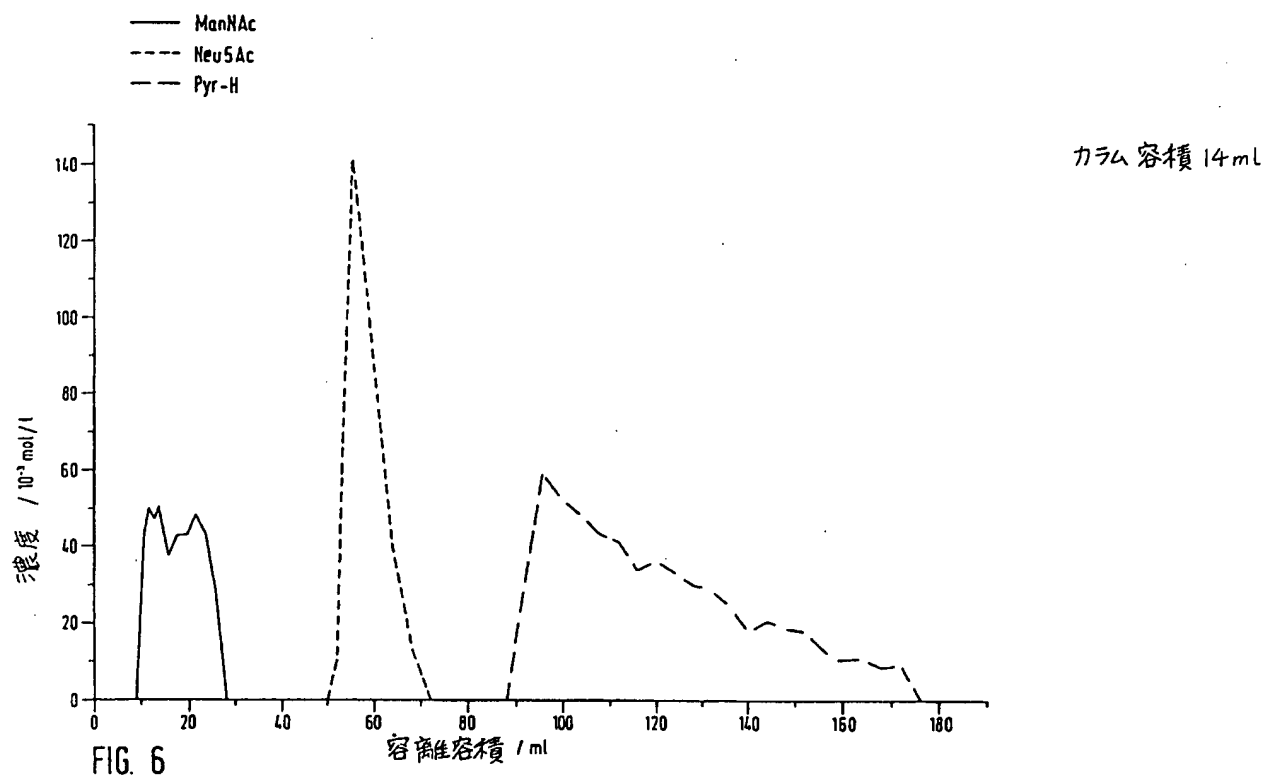


特開平3-180190 (7)





特開平3-180190 (8)



第1頁の続き

- |      |                          |  |
|------|--------------------------|--|
| ⑦発明者 | クリスチアン・ウアン<br>トライ        | ドイツ連邦共和国、ユーリツヒ、ウオルフスホーフエネ<br>ル・ストラーセ、139 |
| ⑦発明者 | オレステ・ギザルバ                | スイス国、ライナツハ・ペー・エル エツシエンウエー<br>ク、3         |
| ⑦発明者 | ダニエル・ギーガツク<br>ス          | スイス国、ヒムメルリート、ウーリツヒウエーク、357               |
| ⑦出願人 | チバ・ガイギー・アク<br>チエンゲゼルシャフト | スイス国、バーゼル、クリベツクストラーセ、141                 |